

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

①
(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 732 971

(21) N° d'enregistrement national : **95 04463**

NHL-NP-37

(51) Int Cl° : C 07 H 21/00, A 61 K 31/70

AL

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 13.04.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 18.10.96 Bulletin 96/42.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : GENSET SOCIETE ANONYME — FR.

(72) Inventeur(s) : BLUMENFELD MARTA.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : REGIMBEAU.

(54) OLIGONUCLEOTIDE SENS INHIBITEUR DE VIRUS HERPES SIMPLEX (HSV) A STRUCTURE EN HALTERE.

(57) Oligonucléotide sens inhibiteur de virus herpès simplex (HSV) à structure en haltère comportant un fragment oligodésoxyribonucléotidique bicaténaire apparié fermé à chaque extrémité par une boucle consistant en un lien covalent non auto-apparié, caractérisé en ce que ledit fragment bicaténaire apparié comporte une séquence d'un site de fixation pour la protéine ICP.

FR 2 732 971 - A1



La présente invention concerne des oligodéoxynucléotides bicaténaires fermés de type sens inhibiteurs de virus herpes simplex et les compositions pharmaceutiques anti virales en comprenant.

5 Les virus herpes simplex de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2) sont des virus humains qui appartient à la famille des herpesviridae, groupe important de virus, dont six sont strictement humains : HSV-1 et HSV-2, le virus de la varicelle et du zona (VZV), le cytomégalovirus (CMV), le virus Epstein-Barr (EBV) et l'herpesvirus type 6 (HHV-6) (Roizman, 1990).

10

Les virus herpes simplex, à la fois dermatropes et neurotropes, donnent des infections d'une remarquable diversité quant à leurs manifestations cliniques et leur degré de gravité. A côté de certaines infections plus ou moins bien tolérées (herpès oral, herpès génital), les
15 deux types d'herpès (HSV-1 et HSV-2) peuvent être à l'origine d'infections d'une extrême gravité : encéphalite herpétique post-natale, herpès néonatal, kératite herpétique, herpès de l'immunodéprimé (Whitley, 1990).

20

Dans les vingt dernières années, la fréquence des infections par les virus herpès simplex, en particulier l'herpès génital, et leur prévalence est en augmentation dans les pays occidentaux et industrialisés. Aux USA, on évalue entre 5 et 25 millions le nombre de sujets atteints et à plus de 300.000 le nombre de nouveaux cas chaque année. En France, on donne
25 une estimation de 310 000 poussées annuelles, dont 82% de formes récidivantes et 18% de formes initiales.

La plupart des antiviraux disponibles à l'heure actuelle, sont des analogues des bases ou des nucléosides constituant les acides nucléiques.
30 Cette classe de médicaments agit en bloquant la réplication virale, en agissant sur les enzymes de réplication. A titre d'exemple, l'aciclovir, un analogue de purine, est utilisé dans le traitement d'infections à virus

herpes simplex type 1 (HSV-1) et type 2 (HSV-2). Après phosphorylation par la thymidine kinase virale dans les cellules infectées, l'aciclovir devient actif et constitue un leurre pour l'ADN polymérase virale. Des souches d'herpes virus 1 et 2 résistantes au traitement par l'aciclovir apparaissent, en particulier chez les patients immunodéprimés. Les souches virales résistantes à l'aciclovir portent habituellement une mutation au niveau du gène codant pour la thymidine kinase, plus rarement au niveau de celui de l'ADN polymérase. On recherche une thérapeutique antivirale qui agisse de façon sélective sur les processus de multiplication du virus sans affecter la cellule hôte, donc dépourvue de toxicité.

Afin de lutter de façon spécifique contre les infections à virus herpes simplex, de nouvelles stratégies reposant sur l'utilisation d'oligonucléotides de synthèse, ont été développées. Un effort important de recherche a été consacré à l'amélioration de la stabilité des oligonucléotides à visées thérapeutiques. On sait en effet que les oligonucléotides sont dégradés, principalement par des exonucléases 3' dans les cellules et dans le sérum (Eder et al., 1991). Dans le cadre des approches antisens, de nombreuses modifications chimiques des nucléotides et des liaisons internucléotidiques ont été développées afin d'obtenir des oligonucléotides résistants aux attaques nucléasiques mais conservant des propriétés d'appariements à leurs cibles (Stein et Cheng, 1993; Milligan et al., 1993; Hélène et Saison-Behmoaras, 1994). Plus récemment, des oligonucléotides antisens phosphodiester, capables d'adopter une structure dite "en agrafe" ont été utilisés pour inhiber la prolifération du virus herpes simplex de type 1 ou 2 (Poddevin et al., 1994).

Les oligonucléotides sens sont des agents pharmacologiques permettant d'inhiber la fixation d'un régulateur transcriptionnel sur un promoteur dont il contrôle l'activité (Clusel et al., 1993; Blumenfeld et Vasseur, 1994). L'inhibition de l'activité biologique d'un régulateur transcriptionnel par compétition avec des leurres oligonucléotidiques comportant sa séquence spécifique de fixation permet de moduler l'expression des gènes placés sous le contrôle du facteur de transcription ciblé.

L'activité thérapeutique d'un oligonucléotide dépend de la cible choisie. Selon la présente invention on utilise un oligonucléotide comportant une séquence de fixation pour le facteur de transcription ICP4 codé par les virus Herpes Simplex.

5

Dans le cas de l'HSV, les premiers gènes à être exprimés après l'infection et avant toute synthèse de protéine virale, sont les gènes précoces immédiats où α : $\alpha 4$, $\alpha 0$, $\alpha 27$, $\alpha 22$ et $\alpha 47$ (Roizman et Sears, 1990). Parmi les produits de gènes α , au moins trois ($\alpha 4$, $\alpha 0$ et $\alpha 27$) sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes précoces (β) et tardifs (γ) d'HSV-1. ICP4, le produit du gène $\alpha 4$ de l'HSV-1, intervient dans l'activation de la transcription des gènes précoces et tardifs du virus (Preston, 1979; Dixon et Schaffer, 1980, DeLuca et Schaffer, 1985). Parmi les nombreuses cibles possibles pour un oligonucléotide sens on a observé que le choix du site de fixation ICP4, constitue une cible très efficace pour bloquer la progression du cycle viral.

La protéine ICP4 est une protéine virale très précoce, qui présente une affinité pour certaines séquences d'ADN, et dont l'activité de transactivation de gènes viraux est requise pour la progression du cycle viral.

L'activité biologique des oligonucléotides sens dépend aussi bien de leur stabilité dans des conditions physiologiques que de leur affinité de liaison aux protéines ciblées. La stabilité des oligonucléotides sens peut être augmentée en introduisant des liaisons covalents entre les deux brins pour donner une structure bicaténaire circulaire ou fermée du type haltère (WO92/19732 ; Clusel et al., 1993; Chu et Orgel, 1992). Les oligonucléotides à structure du type haltère sont constitués par une structure oligonucléotidique bicaténaire appariée encadrée et fermée à chaque extrémité par une boucle consistant en un lien covalent réunissant les deux brins dudit fragment bicaténaire. Cette boucle est en général une séquence oligonucléotiques non auto appariée, mais il peut s'agir d'un lien covalent chimique non nucléotidique. Toutefois, l'affinité de liaison des oligonucléotides bicaténaires circulaires ou fermés vis à vis

de leurs cibles peut néanmoins diminuer en raison des contraintes stériques liées à la structure fermée. Dans ce cas, la fermeture ou circularisation d'un oligonucléotide bicaténaire sens ne représente pas un avantage, mais une perte du potentiel biologique des composés sens.

5

On a découvert selon la présente invention qu'en ce qui concerne un oligonucléotide bicaténaire fermé de type haltère capable de fixer le facteur de transcription ICP4 codé par le gène $\alpha 4$ du virus HSV et présentant des propriétés pour inhiber la multiplication du virus, la
10 production d'un oligonucléotide thérapeutiquement efficace ne relève pas de la simple addition de liens covalents aux extrémités d'une séquence bicaténaire comportant une séquence correspondant audit site de liaison.

La conception d'un oligonucléotide sens bicaténaire fermé à
15 structure du type haltère selon la présente invention requiert en effet l'établissement de certaines règles propres, la protéine ICP4 se fixant à l'ADN, afin d'établir la longueur minimale qui doit séparer le site de fixation des extrémités de la portion bicaténaire de la molécule.

20 Selon la présente invention, les interactions entre la protéine ICP4 et différentes séquences de fixation ont été étudiées sur différentes structures d'oligonucléotide bicaténaire ouverte, en épingle à cheveux ou fermée. Les oligonucléotides bicaténaires fermés sont des molécules circulaires qui présentent une plus grande stabilité que les molécules
25 bicaténaires ouvertes ou en épingle à cheveux de même séquence. On a découvert que les oligonucléotides haltère, peuvent présenter une affinité de fixation spécifique pour la protéine ICP4 égale ou inférieure à celle des oligonucléotides bicaténaires, en fonction de la position de la séquence de fixation par rapport aux extrémités de la portion bicaténaire de
30 l'oligonucléotide fermé. Des oligonucléotides bicaténaires fermés qui présentent une séquence de site de fixation pour ICP4 identique à celle des oligonucléotides bicaténaires ou en épingle à cheveux ont une activité antivirale supérieure à celle obtenue avec des structures bicaténaires ou en épingle à cheveux.

35

La présente invention a donc pour objet des oligonucléotides sens inhibiteur de virus herpes simplex (HSV) à structure en haltère comportant un fragment oligodésoxyribonucléotidique bicaténaire apparié fermé à chaque extrémité par une boucle consistant en un lien covalent, caractérisé en ce que ledit fragment bicaténaire apparié
5 comporte une séquence d'un site de fixation pour la protéine ICP₄.

ICP₄ est une protéine qui se lie de façon spécifique à des séquences d'ADN contenant le motif consensus A T C G T C. Elle se lie aussi à une série
10 d'autres séquences divergeant de cette séquence consensus (Faber et Wilcox, 1988; DiDonato et al., 1991; Everett et al., 1991).

Dans un mode de réalisation particulièrement approprié l'oligonucléotide selon la présente invention comporte la séquence
15 ATCGTC.

Les oligonucléotides du type haltère selon l'invention comportent de 20 à 100, de préférence 30 à 70 nucléotides. De préférence ladite séquence du site de fixation de ICP₄ comporte elle-même de 8 à 20
20 nucléotides.

Dans un mode de réalisation, l'oligonucléotide haltère comporte donc une structure bicaténaire de 13 paires de bases contenant une séquence de reconnaissance du facteur de transcription viral ICP₄ du
25 virus herpes simplex type 1 consistant dans l'une des séquences :

ATCGTCCATACCG

ATCGTCCACACGG

ATCGTCTCTCCGG

De préférence la séquence de reconnaissance du facteur de transcription
30 ICP₄ est la séquence A T C G T C T C T C C G G.

Les séquences mentionnées ci-dessus correspondent au brin direct représenté de gauche à droite dans le sens 5' vers 3'.

On a découvert que de préférence dans le fragment bicaténaire apparié, la séquence du site de fixation de la protéine ICP4 doit être encadrée par au moins 3 nucléotides à chaque extrémité (ce qui correspond donc à au moins 3 paires de bases dans le fragment bicaténaire).

Avantageusement la séquence du site de fixation de ICP4 est encadrée par 3 à 6 nucléotides à chaque extrémité.

10 Dans un mode de réalisation lesdits nucléotides qui encadrent la séquence du site de fixation correspondent aux nucléotides présents naturellement en cette position.

De façon avantageuse, dans les oligonucléotides les liens internucléotidiques sont des liens phosphodiester naturels.

La boucle à chaque extrémité reliant les deux brins du fragment bicaténaire peut être constituée par des structures moléculaires diverses et non nécessairement nucléotidiques. Toutefois, avantageusement, les oligonucléotides selon l'invention comportent une structure bicaténaire dont les extrémités sont reliées par une courte boucle formée par 3, 4 ou 5 nucléotides non auto-appariés.

On cite en particulier les séquences suivantes constituant des boucles présentant les meilleures propriétés : G A A A, G A A, T T T T, TTTT.

La préparation d'oligonucléotides fermés à partir d'oligonucléotides linéaires par les techniques de ligation est connue. En particulier, les oligonucléotides sens bicaténaires fermés qui font l'objet de l'invention peuvent être obtenus par voie chimique, biologique, ou par des approches faisant appel à des combinaisons des techniques de la chimie de synthèse et de la biologie moléculaire. Les oligonucléotides en haltère utilisés ici peuvent donc être préparés à partir d'oligonucléotides linéaires bicaténaires, refermés ensuite par des techniques chimiques ou enzymatiques.

Diverses méthodes de synthèse chimique d'oligonucléotides naturels ont été développées et sont bien connus. Par exemple, et de façon non limitative, les oligonucléotides peuvent être synthétisés par la méthode des phosphoramidites (Caruthers 1985) ou par la chimie des phosphonates (Froehler et al., 1986).

En utilisant l'une ou l'autre de ces techniques ou tout autre procédure séquentielle permettant la synthèse chimique de chaînes polynucléotidiques de séquence déterminée à l'avance, on obtient des oligonucléotides linéaires qu'il est possible de fermer par voie biologique, à l'aide d'enzymes de ligation, ou par voie chimique.

Dans le cas de la ligation enzymatique, les oligonucléotides doivent comporter un groupement terminal 5' phosphate, la phosphorylation du 5' terminal ayant été effectuée par voie chimique, ou bien par voie biologique en utilisant une kinase (polynucléotide kinase) et de l'ATP ou tout autre donneur de phosphaté.

Dans le cas de fermeture par ligation chimique, les oligonucléotides peuvent comporter un groupement phosphate terminal soit en 3', soit en 5', et la ligation chimique peut être faite en présence des réactifs tels que la carbodiimide ou le bromure de cyanogène ou tout autre réactif capable de catalyser la formation d'un lien internucléotidique (Dolinnaya et al., 1993).

D'autres voies chimiques de préparation des oligonucléotides bicaténaire fermés peuvent être utilisées. On peut synthétiser les oligonucléotides linéaires par voies usuelles, on ferme ensuite par ligation chimique ou par une liaison faisant intervenir des nucléotides terminaux.

Différents nucléotides peuvent rentrer dans la formulation d'oligonucléotides. Les oligonucléotides faisant l'objet de la présente invention sont composés par une séquence de bases nucléotidiques comportant notamment de l'adénine (A), de la guanine (G), de la cytosine (C), de la thymine (T) et de l'uracile (U), reliées entre elles par des liaisons internucléotidiques, notamment naturelles c'est-à-dire phosphodiester.

Les oligonucléotides selon l'invention peuvent également comporter des nucléotides rares (Inosine, I, ou rI par exemple) ou des nucléotides modifiés, soit en série désoxyribo- soit en série ribo-.

5 Les oligonucléotides selon l'invention peuvent comporter des nucléotides réactifs, capables d'établir des liens avec la séquence de la molécule cible complémentaire à l'oligonucléotide, ou, dans une autre application, des liens intra-moléculaires au sein même de l'oligonucléotide.

10

Ainsi, les oligonucléotides selon l'invention peuvent porter des groupements réactifs greffés sur les nucléotides, comme par exemple des groupements psoralènes, ou d'autres agents de pontage ou agents intercalants pouvant réagir avec la séquence de la molécule cible
15 complémentaire à l'oligonucléotide. Dans un cas particulièrement intéressant des groupements réactifs greffés sur certains des nucléotides de l'oligonucléotide pourront induire la formation d'un pontage intramoléculaire au sein même de la molécule.

20 L'oligonucléotide pourra comporter des liaisons internes produites par des agents réactifs appartenant ou n'appartenant pas à la structure de la molécule elle-même.

Font également partie de l'invention des oligonucléotides dits
25 chimériques, constitués par l'assemblage covalent de fragments nucléotidiques et non-nucléotidiques, notamment en ce qui concerne les boucles aux extrémités.

Les oligonucléotides selon l'invention peuvent être associés à une
30 structure moléculaire favorisant la pénétration, le ciblage ou l'adressage cellulaire ou intra-cellulaire.

Parmi des molécules permettant d'accroître leur pénétration intracellulaire, on peut citer en particulier des groupements lipophiles,
35 des polypeptides ou des protéines.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comportant à titre de principe actif au moins un oligonucléotide selon l'invention et un excipient notamment approprié pour une application topique ou systématique.

5

Ces compositions sont particulièrement utiles pour lutter contre les infections virales dues aux virus HSV-1 et HSV-2. Elles permettent de contrôler la prolifération virale.

10

Elle peuvent comporter un autre principe actif antiviral tel qu'un oligonucléotide antisens anti HSV ou un composé analogue de nucléoside antiviral anti HSV, tel que l'acyclovir.

15

Dans un mode de réalisation, l'oligonucléotide anti-sens est dirigé contre une séquence des pré-ARNm IE₄ et IE₅ du virus HSV.

20

De préférence elle comporte un oligonucléotide comportant la séquence A T C G T C T C T C C G G comme site de fixation de ICP4. Il s'agit en particulier de l'oligonucléotide haltère GT5210 représenté figure 1.

25

Des formulations galéniques adéquates peuvent être établies afin d'optimiser la délivrance de ces molécules à leurs cellules cibles. Ainsi par exemple, les composés selon l'invention pourront être encapsulés dans des liposomes, des nanoparticules, des particules LDL, ou dans tout autre type de micro-sphères permettant une conservation adéquate et favorisant le ciblage. Les oligonucléotides peuvent également être associés à des agents surfactants cationiques.

30

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre en référence aux Figures 1 à 5.

La Figure 1 représente les oligonucléotides utilisés dans les exemples. Les oligonucléotides ont été synthétisés et utilisés dans les expériences décrites dans les exemples, soit sous forme bicaténaire ouverte, soit sous forme d'épingle à cheveux, soit sous forme bicaténaire fermée. Quatre familles d'oligonucléotides ont été synthétisées dont les séquences sont présentées dans la Figure 1.

La séquence consensus de fixation d'ICP4 (DiDonato et al., 1991) est souligné dans chaque type d'oligonucléotide. L'oligonucléotide GT7202, bicaténaire, 24 paires de bases (pdb), contient un site de fixation pour ICP4 présent dans le promoteur du gène codant pour la glycoprotéine gD (Faber and Wilcox, 1986); dans cet oligonucléotide la séquence de fixation d'ICP4 (13 pdb, souligné dans la figure) est entourée par 5 et 6 pdb en amont et en aval du site, respectivement.

L'oligonucléotide GT7201 comporte 17 pdb et contient le même site de fixation d'ICP4 que GT7202 mais ayant seulement deux pdb en amont et en aval de la séquence de fixation d'ICP4 (13 pdb, souligné dans la figure).

L'oligonucléotide GT 7209 bicaténaire de 24 paires de bases contient un site de fixation pour ICP4 présent dans le promoteur du gène $\alpha 4$ codant pour ICP4 (Faber et Wilcox, 1988); dans cet oligonucléotide la séquence de fixation d'ICP4 comporte 13 pdb (soulignées dans la figure), elle est entourée par 5 et 6 pdb en amont et en aval du site, respectivement.

L'oligonucléotide GT 7210 bicaténaire de 24 paires de bases contient un site de fixation pour ICP4 situé à 740 pb en amont du gène $\alpha 0$, et faisant partie d'un promoteur fonctionnel des classes de gènes α/β (Bohenzky et al., 1993); dans cet oligonucléotide la séquence de fixation d'ICP4 (13 pdb, souligné dans la figure) est entourée par 5 et 6 pdb en amont et en aval du site, respectivement.

L'oligonucléotide GT7212 bicaténaire de 24 paires de bases, correspond au contrôle négatif de fixation d'ICP4. Dans cet oligonucléotide, la séquence de fixation d'ICP4 correspondant au site présent dans GT7210 a été mutée à sept positions (nucléotides indiqués en petites lettres dans la figure). Cette séquence mutée n'est plus liée par la protéine ICP4 (voir Figure 3).

Les oligonucléotides GT6201, GT6202, GT6209, GT6210 et GT6212, présentent une structure en épingle à cheveux, et correspondent aux séquences bicaténaires GT7201, GT7202, GT7209, GT7210 et GT7212, respectivement, liées par une boucle de 5T à une extrémité.

Les oligonucléotides GT5201, GT5202, GT5209, GT5210 et GT5212, présentent une structure bicaténaire fermée en haltère, et correspondent aux séquences bicaténaires GT7201, GT7202, GT7209, GT7210 et GT7212, respectivement, liées par une boucle de 5T à chaque extrémité.

La figure 2 représente les résultats de fixation d'ICP4 sur un oligonucléotide bicaténaire fermé et montre que la fixation dépend de la position du site de fixation dans la partie bicaténaire de la molécule fermée.

Les affinités relatives d'ICP4 vis à vis des oligonucléotides GT7201, GT7202, GT6201, GT6202, GT5201 et GT5202 ont été déterminées par des expériences de compétition sur gel de retard selon la technique décrite dans Mat. et Meth., en utilisant GT7202 comme sonde radioactive. La radioactivité liée à ICP4 en présence d'un excès molaire de 100 fois de chaque oligonucléotide a été quantifiée, et les affinités relatives ont été déterminées en considérant comme 100% la compétition observée pour l'oligonucléotide GT7202 froid.

Les séquences des oligonucléotides sont celles décrites dans la Figure 1.

La Figure 3 représente l'autoradiographie d'un retard sur gel montrant que la protéine ICP4 se lie à différents sites de fixation avec différentes affinités relatives.

Les séquences des oligonucléotides sont décrites dans la Figure 1.

La technique de retard sur gel est décrite dans Mat. et Meth.

- 5 La bande spécifique correspondant à ICP4 est indiquée par une flèche; nsMm et nsMi indiquent, respectivement, des activités de fixation cellulaires ou virales non spécifiques.

- 10 Les réactions de fixation d'ICP4 sont menées avec la sonde radioactive GT7210 et 10 µg de protéines nucléaires des cellules MRC5 infectées par HSV-1, en l'absence (pistes 2, 3 et 10) ou en présence des quantités indiquées de compétiteurs GT7210 (piste 4-6), GT6210 (pistes 7-9), GT7209 (pistes 11-13) ou GT6209 (pistes 14-16).

- 15 Le panneau inférieur montre une exposition plus longue de la même autoradiographie.

- 20 La Figure 4 représente l'autoradiographie d'un retard sur gel montrant que les oligonucléotides bicaténaires fermés contenant un site ICP4 de haute affinité relative, sont reconnus de façon spécifique par ICP4 et avec une affinité similaire à celle des molécules en épingle à cheveux ou des molécules bicaténaires.

- 25 Sur cette Figure, sont représentées les expériences de compétition avec les oligonucléotides non radioactifs GT7210, GT6210, GT5210 et contrôles GT7212, GT6212 ou GT5212.

- 30 Les séquences des oligonucléotides sont celles décrites dans la Figure 1. La technique de retard sur gel est décrite dans Mat. et Meth.

La bande spécifique correspondant à ICP4 est indiquée par une flèche; nsMm indique une activité de fixation cellulaire non spécifique.

Les réactions de fixation d'ICP4 sont menées avec la sonde radioactive GT7210 et 10 µg de protéines nucléaires des cellules MRC5 infectées par HSV-1, en absence (pistes 2 et 12) ou en présence des quantités indiquées de compétiteurs GT7210 (pistes 3-5), GT6210 (pistes 6-8), GT5210 (9-11). Les oligonucléotides contrôles GT7212 (piste 13), GT6212 (piste 14) et GT5212 (piste 15) ont été utilisés en excès molaire de 500 fois.

La Figure 5 représente l'étude comparative des activités anti HSV-1 des oligonucléotides sens bicaténaire GT7210, en épingle à cheveux GT6210 et bicaténaire fermé GT5210.

Des cellules MRC5 en duplicat sont traitées avec les concentrations indiquées d'oligonucléotides GT7210, GT6210 ou GT5210, ou d'oligonucléotides contrôles GT7210, GT6212 ou GT5212 (voir Figure 1), en présence de 10 µg/ml de lipofectine, comme décrit dans Mat. et Meth.

L'activité de 0% d'inhibition (témoin virus) correspond au titre du virus traité avec la lipofectine en absence d'oligonucléotides. Dans les conditions expérimentales décrites, le titre du témoin virus traité avec la lipofectine correspond à 90% du titre du virus non traité.

Les résultats présentés correspondent à une moyenne de 2 expériences indépendantes; les valeurs des écarts types ne dépassent pas 10 % GT5210 (cercles); GT6210 (carrés); GT7210 (losange); GT5212 (croix); GT6212 (tiret); GT7212 (triangle).

EXEMPLE 1: MISE EN ÉVIDENCE DE LA FIXATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ICP4 DU VIRUS HSV-1 PAR DES OLIGONUCLÉOTIDES DE TYPE SENS

1. Préparation des oligonucléotides sens, fermés, à partir d'oligonucléotides linéaires par la technique de ligation chimique.

Les conditions expérimentales permettant une ligation chimique efficace des oligonucléotides synthétisés sous forme 3'P, sont les suivantes: 100 D.O. (1 D.O.₂₆₀ = 33 µg/ml) d'oligonucléotide linéaire 3'P sont dissous dans 450 µl de tampon MES pH 7.5, et sont incubés 1-2 min à 95°C, puis
 5 refroidis lentement durant 2-3 h, pour être enfin transférés à 4°C. On ajoute 20 mM MgCl₂ et 0,5 M CNBr (volume final=500 µl) et on incube à 4°C pendant 1 min. Après l'incubation, la réaction est arrêtée par addition de 100 µl d'acétate de potassium 3M, et de 1 ml d'éthanol absolu. Les oligonucléotides sont précipités, et les oligonucléotides bicaténaires
 10 fermés sont purifiés par chromatographie liquide de haute pression sur phase inversée (RP-HPLC), utilisant une colonne PRP-3 C18 (300 Å, 10 µm).

2. Préparation des extraits nucléaires à partir de cellules MRC5 infectées par HSV-1.

15 Les cellules MRC5 (2 × 10⁷ cellules) sont infectées avec HSV-1 à une m.o.i. (multiplicité d'infection) de 10 pfu/cellule. Après 1 heure d'adsorption à 37°C, les cellules sont rincées 2 fois avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline), puis recouvertes de milieu MEM complet
 20 supplémenté de 2% de sérum de veau foetal. Les cellules infectées sont récoltées 16 heures après l'infection.

Les cellules témoins non infectées sont préparées en parallèle selon le même protocole. Les extraits nucléaires provenant de cellules infectées
 25 ou non ont été préparés selon la méthode décrite par Cereghini et al. (1987), avec comme modifications l'introduction de 5 µg/ml d'aprotinine et de leupeptine.

3. Technique de retard sur gel.

30 Afin d'envisager une possible application thérapeutique des oligonucléotides bicaténaires fermés décrits dans la présente invention, il est essentiel d'examiner la capacité de ces oligonucléotides à se fixer spécifiquement sur leur cible, dans un système d'étude in vitro. La

technique de retard sur gel (Fried et Crothers, 1981; Garner et Revzin, 1981) est une méthode très sensible, qui permet d'analyser de façon simple et rapide la spécificité ainsi que les affinités relatives des protéines se liant à l'ADN pour leur sites de fixation présents dans des oligonucléotides.

5

Les oligonucléotides sont marqués à l'extrémité 5' terminale par phosphorylation avec l'ATP (γ - ^{32}P = 3000 Ci/mmol) et la polynucléotide kinase du bactériophage T4, selon des protocoles standards. Les réactions de fixation de la protéine ICP4 avec les différents oligonucléotides sont réalisées dans un mélange réactionnel de 20 μl contenant: 10 mM Hepes pH 10 7.9, 10% (vol/vol) de glycérol, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.25 mM PMSF, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinine, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptine, 1 ng (25000 cpm) de sonde radioactive, 1 μg de DNA de sperme de saumon soniqué, 1 μg poly(dI-dC).poly(dIdC), et 2-10 μg d'extrait nucléaire des cellules MRC-5 15 infectées par l'HSV-1. Après une incubation de 10 minutes dans la glace, les échantillons sont soumis à une migration électrophorétique à 12 V/cm dans un gel non dénaturant à 6% de polyacrylamide contenant 0.25X TBE.

Le gel est fixé et séché pour être ensuite soumis à une 20 autoradiographie. Les bandes correspondant au complexe ICP4-sonde radioactive et à la sonde libre sont repérées à l'aide de l'autoradiographie, et quantifiées dans un compteur de radioactivité à scintillation liquide.

La comparaison des affinités relatives d'ICP4 pour les différents 25 oligonucléotides est réalisée par des expériences de compétition avec des oligonucléotides non radiomarqués. Dans ce cas, la sonde radioactive contenant une séquence de fixation d'ICP4 est ajoutée au mélange réactionnel en même temps que l'oligonucléotide compétiteur froid.

30 4. Résultats

4.1. L'affinité d'ICP4 pour son site de fixation spécifique contenu dans un oligonucléotide bicaténaire fermé dépend de la position du site de fixation par rapport aux extrémités de la portion bicaténaire de la 35 molécule fermée.

Comme le montre la Figure 2, l'affinité relative de la protéine ICP4 vis à vis d'une séquence particulière de fixation contenu dans une structure bicaténaire ouverte ou en épingle à cheveux, ne varie pas en fonction de la position de ce site par rapport aux extrémités de la molécule.

5 Ainsi, dans le cas du site correspondant à la séquence de fixation présent dans le promoteur de la glycoprotéine D, ICP4 se lie avec la même affinité au site consensus contenu dans les molécules bicaténaires GT7201 (Figure 1, deux pdb en amont et en aval du site consensus) et GT7202 (Figure 1, cinq et six pdb en amont et en aval du site consensus, respectivement), ou

10 en épingle à cheveux GT6201 (Figure 1, deux pdb en amont et en aval du site consensus) et GT6202 (Figure 1, cinq et six pdb en amont et en aval du site consensus, respectivement).

Par contre, avec des oligonucléotides fermés, ICP4 se fixe avec une

15 affinité réduite de 5-10 fois (Figure 2) quand la séquence consensus est entourée par seulement deux pdb en amont et en aval (GT5201; Figure 1), mais présente une affinité comparable aux autres structures quand la séquence consensus est entourée par cinq et six pdb en amont et en aval, respectivement (GT5202; Figure 1).

20

Ces résultats montrent que ces molécules bicaténaires ont des contraintes liées à leur structure qui induisent des conformations non appropriées pour la fixation spécifique des protéines se liant à l'ADN. Dans certains cas comme pour GT5201, la circularisation de l'oligonucléotide

25 bicaténaire GT7201 ne produit pas l'avantage attendu concernant la stabilisation de la molécule, mais induit plutôt la perte de l'activité biologique. La production d'un oligonucléotide sens bicaténaire fermé efficace pour fixer ICP4 requiert donc l'établissement de certaines règles propres à ce type de protéine se fixant à l'ADN en ce qui concerne la

30 longueur minimale qui doit séparer le site de fixation des extrémités de la portion bicaténaire de la molécule. La production d'un oligonucléotide sens bicaténaire fermé ne relève pas donc de la simple addition de "linkers" covalents aux extrémités d'une séquence bicaténaire connue.

35

4.2. L'affinité d'ICP4 varie en fonction de la séquence du site de fixation.

Comme le montre la Figure 3, les profils de compétition des oligonucléotides bicaténaires GT7209 et GT7210 sont différents, l'affinité d'ICP4 pour l'oligonucléotide GT7210 étant 10 fois supérieure à celle de GT7209 (Figure 3, comparer les pistes 5 et 6 aux pistes 12 et 13). Le même type de résultats sont obtenus avec les oligonucléotides en épingle à cheveux (GT6209 et GT6210; Figure 3 : comparer les pistes 8 et 9 aux pistes 15 et 16). Des résultats similaires ont été observés pour les oligonucléotides GT6202 et GT7202 (résultats non montrés).

Dans tous les oligonucléotides, la longueur de la portion bicaténaire (24 pdb), ainsi que la position du site (5 et 6 pdb en amont et en aval du site, respectivement) sont comparables, la différence étant dans les séquences mêmes des sites de fixation. Les oligonucléotides GT6209 et GT7209 contiennent un site de fixation pour ICP4 présent dans le promoteur du gène $\alpha 4$ codant pour ICP4 (Faber et Wilcox, 1988); les oligonucléotides GT6202 et GT7202 contiennent un site de fixation pour ICP4 présent dans le promoteur du gène codant pour la glycoprotéine gD (Faber and Wilcox, 1986); tandis que les oligonucléotides GT6210 et GT7210, contiennent un site de fixation potentiel situé à 740 pb en amont du gène $\alpha 0$, et faisant partie d'un promoteur fonctionnel des classes de gènes α/β (Bohenzky et al., 1993). Ce site potentiel de fixation représente donc un site de fixation de haute affinité relative.

4.3. La fixation d'ICP4 sur un oligonucléotide bicaténaire fermé de type "haltère" contenant un site de haute affinité relative est spécifique et comparable à celle concernant un oligonucléotide bicaténaire ouvert ou en épingle à cheveux.

La Figure 4 montre un retard sur gel illustrant la comparaison des affinités d'ICP4 vis à vis des oligonucléotides bicaténaire ouvert, en épingle à cheveux ou bicaténaire fermé de type "haltère" (GT7210, GT6210 et GT5210, respectivement; Figure 1), contenant un site de fixation à haute

affinité (voir Figure 3). Dans tous ces cas, la séquence de fixation d'ICP4 est entourée par 5 et 6 pdb en amont et en aval du site, respectivement. Il apparaît clairement dans cette figure que la fixation d'ICP4 sur la sonde radioactive GT7210 est déplacée de façon comparative par les différents oligonucléotides compétiteurs (Figure 4, comparer les pistes 3-5, 6-8 et 9-11 à la piste 2).

Par ailleurs, l'interaction d'ICP4 avec l'oligonucléotide bicaténaire fermé GT5210 est spécifique, comme l'indique le résultat de la compétition avec un grand excès d'oligonucléotide bicaténaire fermé muté (GT5212 -voir Figure 1-; Figure 4, comparer les pistes 9-11 à la piste 15).

EXEMPLE 2: INHIBITION DE LA MULTIPLICATION DE HSV-1 PAR DES OLIGONUCLÉOTIDES DE TYPE SENS.

15

1. Etude de l'activité des oligonucléotides sens.

Pour atteindre leurs cibles les oligonucléotides, molécules polyanioniques, doivent franchir la membrane plasmique. En formant un complexe stable avec les oligonucléotides, les lipides cationiques comme la lipofectine (Gibco) facilitent la pénétration et augmentent de façon importante l'activité des oligonucléotides antisens (Chiang et al., 1991; Bennett et al., 1992; Capaccioli et al., 1993). On a donc étudié l'effet antiviral des oligonucléotides sens en présence de lipofectine, à des concentrations compatibles avec une viabilité cellulaire supérieure à 90%, et sans effet sur les interactions virus-cellules.

25

2. Infection des cellules en présence ou en l'absence d'oligonucléotides sens.

30

Les cellules MRC-5 (ATCC) sont cultivées en milieu MEM (Gibco) complémenté de 5% de sérum de veau foetal, de L-glutamine, d'acides aminés non essentiels et de pénicilline-streptomycine. Après ensemencement à une densité de 60 000 cellules par puits de 2 cm², les

cellules sont incubées durant 16 à 24 h à 37°C en atmosphère humide enrichie en CO₂ (7%). Les cellules sont rincées avec du PBS puis exposées durant 4 h aux complexes oligonucléotides-lipofectine distribués sous un volume de 500 µl par puits. Les concentrations d'oligonucléotides varient de 0.05 µM à 1 µM alors que la lipofectine est utilisée à raison de 10µg/ml.

Au terme d'une incubation de 4 h à 37°C, le milieu est aspiré de chaque puits et les cellules sont de nouveau rincées avec du PBS puis recouvertes de milieu OPTI-MEM (Gibco). Après une nouvelle incubation d'une heure à 37°C, les cellules sont infectées avec HSV-1 à une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 3 p.f.u./cellule en présence ou en l'absence d'oligonucléotides sans lipofectine.

Un volume de 250 µl d'oligonucléotides en solution (2x concentrés) dans du milieu OPTI-MEM est déposé sur la monocouche cellulaire et, 5 minutes après, une solution virale de 50 µl est déposée dans chaque puits de la microplaque. L'incubation est poursuivie pendant 1 heure sous une agitation douce. Après addition de 200 µl par puits de milieu opti-MEM, les plaques sont maintenues durant 24 h à 37°C. Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, les complexes oligonucléotides-lipofectine se révèlent faiblement toxiques (<10%) ou atoxiques pour les cellules. Après apparition de l'effet cytopathique, les réactions sont arrêtées par congélation des plaques dans de l'azote liquide.

3. Titrage du virus.

Les titrages ont été effectués par "*yield reduction*" selon le protocole décrit par Poddevin et al.(1994).

Toutes les mesures sont effectuées en duplicat. Les virus intracellulaires sont libérés dans le milieu de culture après 3 cycles rapides de congélations dans l'azote liquide et de décongélations à 37°C. Ils sont ensuite dilués dans du milieu sans sérum pour effectuer le titrage proprement dit.

Les cellules sont ensemencées la veille en milieu complet (2.5×10^5 /puits de 4 cm^2). Le lendemain, le milieu est aspiré et on dépose $200 \mu\text{l}$ de différentes dilutions virales par puits. Après une incubation d'une heure à 37°C avec agitation douce mais constante, le milieu est aspiré et les
5 cellules sont recouvertes avec du milieu complet (2.5% en sérum) contenant 1.2% de méthyl-cellulose pour une incubation de 3 jours à 37°C .

Après 3 jours, le milieu est éliminé, les cellules sont fixées avec une solution de PBS/10% formol pendant 20 minutes puis colorées au crystal violet. Les plaques sont ensuite rincées et les plages comptées par
10 transillumination avec le négatoscope. Les titrages sont effectués par rapport aux titres viraux observés en l'absence d'oligonucléotides.

4. Résultats

15

La Figure 5 montre une étude comparative de l'inhibition de la prolifération de HSV-1 induite par des oligonucléotides contenant un site de haute affinité relative pour ICP4 sous la forme de structure bicaténaire ouverte (GT7210), en épingle à cheveux (GT6210) ou bicaténaire fermé
20 (GT5210), pour des concentrations allant de 50 nM à $1 \mu\text{M}$. Les courbes présentent une allure biphasique, l'effet inhibiteur diminuant systématiquement aux concentrations d'oligonucléotides plus élevées. Ce phénomène semble dû à une saturation des lipides cationiques à des concentrations croissantes d'oligonucléotides.

25

L'oligonucléotide bicaténaire fermé GT5210 est d'emblée très actif à très faible concentration, puisqu'il induit près de 80% d'inhibition à 50 nM , alors que les autres oligonucléotides, bicaténaire GT7210 et en épingle à cheveux GT6210, sont inactifs à cette même concentration. L'activité
30 antivirale de GT5210 augmente avec la concentration de l'oligonucléotide, pour atteindre 90% d'inhibition à 100 nM .

L'oligonucléotide en épingle à cheveux GT6210 produit une réduction du titre viral de 5% à 50 nM et un maximum de 60% à 250 nM ,
35 tandis que l'oligonucléotide bicaténaire GT7210 produit une inhibition de 20% à 50 nM et atteint 55% à 500 nM (Figure 5).

Quelle que soit leur structure, les oligonucléotides témoins mutés GT7212, GT6212 ou GT5212, sont inactifs aux concentrations testées.

Les résultats illustrés dans la Figure 5 montrent que la concentration inhibitrice 50% (IC_{50}) de l'oligonucléotide bicaténaire fermé GT 5210 est inférieure à 50 nM, et que la concentration inhibitrice 90% (IC_{90}) est de 100 nM. Aucune cytotoxicité n'étant observée aux concentrations allant jusqu'à 100 μ M, l'index thérapeutique pour l'oligonucléotide bicaténaire fermé GT 5210 est supérieur à 1000.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bennett, C.F., M-Y. Chiang, H. Chan, J.E.E. Shoemaker and C.K. Mirabelli
5 (1992), *Mol. Pharmacol.* 41,1023-1033.
2. Blumenfeld, M. and M. Vasseur (1994), *Médecine/sciences* 10, 274-281.
3. Bohenzky, R.A., A.G. Papavassiliou, I.H. Gelman and S. Silverstein (1993),
J. Virol. 67, 632-642.
4. Capaccioli, S., G. DiPasquale, E. Mini, T. Mazzei and A. Quattrone (1993),
10 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 197, 818-825.
5. Caruther, M.H. (1985), *Science* 230, 281-285.
6. Cereghini, S., M. Raymondjean, A. Garcia Carranca, P. Herbomel and M.
Yaniv (1987), *Cell* 50, 627-638.
7. Chiang, M-Y., H. Chan, M.A. Zounes, S.M. Freier, W.F. Lima and C.F.
15 Bennett (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 18162-18171.
8. Chu, B.C.F. and L.E. Orgel (1992), *Nucleic Acids Res.* 20, 5857-5858.
9. Clusel, C., E. Ugarte, N. Enjolras, M. Vasseur and M. Blumenfeld (1993),
Nucleic Acids Res. 21, 3405-3411.
10. DeLuca, N.A. and P.A. Schaffer (1985), *Mol. Cell. Biol.* 5, 1997-2008.
- 20 11. DiDonato, J.A., J.R. Spitzner and M.T. Muller (1991), *J. Mol. Biol.* 219,
451-470.
12. Dixon, R.A.F. and P.A. Schaffer (1980), *J. Virol.* 36, 189-203.
13. Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Mernkova, I.N., Oretskaya, T.S.,
Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M. and Shabarova, Z.A.
25 (1993), *Nucleic Acids Res.* 21, 5403-5407.
14. Everett, R.D., M. Elliot, G. Hope and A. Orr (1991), *Nucleic Acids Res.* 19,
4901-4908.
15. Faber, S.W. and K.W. Wilcox (1986), *Nucleic Acids Res.* 14, 6067-6083.
16. Faber, S.W. and K.W. Wilcox (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 555-570.
- 30 17. Fried, M. and Crothers, D.M. (1981), *Nucleic Acids Res.* 9, 6505-6525.
18. Froehler, B.C., Ng, P. and Mateucci, M.D. (1986), *Nucleic Acids Res.* 14,
5399-5407.
19. Garner, M.M. and Revzin, A. (1981), *Nucleic Acids Res.* 9, 3047-3060.
20. Hélène, C. and E. Saison-Behmoaras (1994), *Médecine/sciences* 10,
35 253-273.

21. Milligan, J.F., M.D. Mateucci and J.C. Martin (1993), *J. Med. Chem.* 36, 1923-1937.
22. Poddevin, B., S. Meguenni, I. Elias, M. Vasseur and M. Blumenfeld (1994), *Antisense Res. Dev.* 4, 147-154.
- 5 23. Preston, C.M. (1979), *J. Virol.* 29, 275-284.
24. Roizman, B. (1990). In: Fields, B., Knipe, D.M. (eds) *Virology*, Raven Press, New York, pp1787-1793.
25. Roizman, B and Sears, A.E. (1990). In: Fields, B., Knipe, D.M. (eds) *Virology*, Raven Press, New York, pp1794-1841.
- 10 26. Shepard, A.A. and N.A. DeLuca (1991), *J. Virol.* 65, 787-795.
27. Stein, C.A. and Y.-C. Cheng (1993), *Science* 261, 1004-1012.
28. Whitley, R.J. (1990). In: Fields, B., Knipe, D.M. (eds) *Virology*, Raven Press, New York, pp1843-1887.

REVENDEICATIONS

1. Oligonucléotide sens inhibiteur de virus herpes simplex (HSV) à
5 structure en haltère comportant un fragment
oligodésoxyribonucléotidique bicaténaire apparié fermé à chaque
extrémité par une boucle consistant en un lien covalent, caractérisé en ce
que ledit fragment bicaténaire apparié comporte une séquence d'un site
de fixation pour la protéine ICP4.
- 10 2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce que
ladite séquence d'un site de ICP4 comprend la séquence A T C G T C.
3. Oligonucléotide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce
15 que ladite séquence du site de fixation de ICP4 comporte de 10 à 20
nucléotides.
4. Oligonucléotide selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé
en ce que la séquence du site de fixation de la protéine ICP4 consiste dans
20 l'une des séquences suivantes :
ATCGTCCATACCG
ATCGTCCACACGG
ATCGTCTCTCCGG
- 25 5. Oligonucléotide selon la revendication 4
caractérisé en ce que la séquence du site de fixation consiste dans la
séquence A T C G T C T C T C C G G.
6. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en
30 ce que dans le fragment bicaténaire apparié, la séquence du site de
fixation de la protéine ICP4 est encadrée sur le même brin par au moins 3
nucléotides à chaque extrémité avant la boucle.
7. Oligonucléotide selon la revendication 6 caractérisé en ce que la
35 séquence du site de fixation de ICP4 est encadrée par 3 à 6 nucléotides à
chaque extrémité avant la boucle.

8. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7 caractérisé en ce que lesdits nucléotides qui encadrent la séquence du site de fixation à la protéine ICP4 correspondent aux nucléotides présents naturellement en cette position.

5

9. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que les liens internucléotidiques sont des liens phosphodiesters naturels.

10

10. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que la boucle est constituée de 3 à 5 nucléotides.

15

11. Oligonucléotide selon la revendication 10 caractérisé en ce que la boucle est constituée par une des séquences suivantes : G A A A, G A A, TTTT, TTTTT.

20

12. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'oligonucléotide consiste dans l'oligonucléotide haltère GT 5210, représenté figure 1.

25

13. Composition pharmaceutique anti virale contre un virus Herpes Simplex, notamment HSV1 et HSV2 comportant un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 12 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

30

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comporte un véhicule approprié pour une application topique ou systémique.

15. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 13 à 14 caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un véhicule facilitant le ciblage et la pénétration cellulaire.

35

16. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 13 à 15 caractérisée en ce qu'elle comporte un autre principe actif antiviral tel qu'un oligonucléotide antisens anti HSV ou un composé analogue de nucléoside antiviral anti HSV, tel que l'acyclovir.

17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'oligonucléotide anti-sens est dirigé contre une séquence des pré-ARNm IE₄ et IE₅ du virus HSV.

OLIGONUCLEOTIDES BICATENAIRES	OLIGONUCLEOTIDES EN EPINGLE A CHEVEUX	OLIGONUCLEOTIDES BICATENAIRES FERMES
5'CTA TCG TCC ATA CCG AC3' 3'GAT AGC AGG TAT GGC TGT5' GT7201	5'CTA TCG TCC ATA CCG AC T T 3'GAT AGC AGG TAT GGC TGT T T GT6201	T T CTA TCG TCC ATA CCG AC T T T T GAT AGC AGG TAT GGC TGT T T GT5201
5'ACA CTA TCG TCC ATA CCG ACC ACA3' 3'TGT GAT AGC AGG TAT GGC TGG TGT5' GT7202	5'ACA CTA TCG TCC ATA CCG ACC ACA T T 3'TGT GAT AGC AGG TAT GGC TGG TGT T T GT6202	T T ACA CTA TCG TCC ATA CCG ACC ACA T T T T TGT GAT AGC AGG TAT GGC TGG TGT T T GT5202
5'CCC CGA TCG TCC ACA CCG AGC GCG3' 3'GGG GCT AGC AGG TGT GCC TCG CGC5' GT7209	5'CCC CGA TCG TCC ACA CCG AGC GCG T T 3'GGG GCT AGC AGG TGT GCC TCG CGC T T GT6209	T T CCC CGA TCG TCC ACA CCG AGC GCG T T T T GGG GCT AGC AGG TGT GCC TCG CGC T T GT5209
5'CTG CCA TCG TCT CTC CCG AGA GCG3' 3'GAC GGT AGC AGA GAG GCC TCT CGC5' GT7210	5'CTG CCA TCG TCT CTC CCG AGA GCG T T 3'GAC GGT AGC AGA GAG GCC TCT CGC T T GT6210	T T CTG CCA TCG TCT CTC CCG AGA GCG T T T T GAC GGT AGC AGA GAG GCC TCT CGC T T GT5210
5'CTG CCG CAG TAT CGC ACG AGA GCG3' 3'GAC GCG ctc AIA GcG iCa TCT CGC5' GT7212	5'CTG CCG CAG TAT CGC ACG AGA GCG T T 3'GAC GCG ctc AIA GcG iCa TCT CGC T T GT6212	T T CTG CCG CAG TAT CGC ACG AGA GCG T T T T GAC GCG ctc AIA GcG iCa TCT CGC T T GT5212

FIG. 1

<u>TYPE D'OLIGONUCLEOTIDE</u>	<u>AFFINITE RELATIVE POUR ICP4</u>
<u>BICATENAIRE</u>	
GT7201	100
GT7202	100
<u>EPINGLE A CHEVEUX</u>	
GT6201	100
GT6202	100
<u>BICATENAIRE FERME</u>	
GT5201	15
GT5202	100

FIG. 2

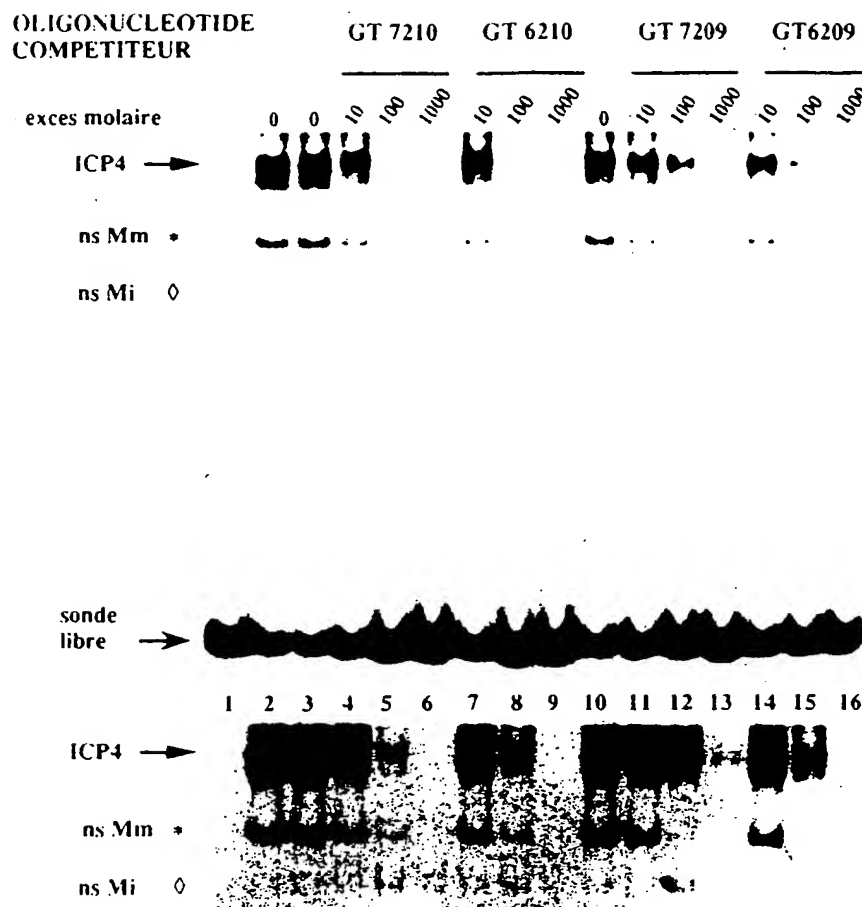
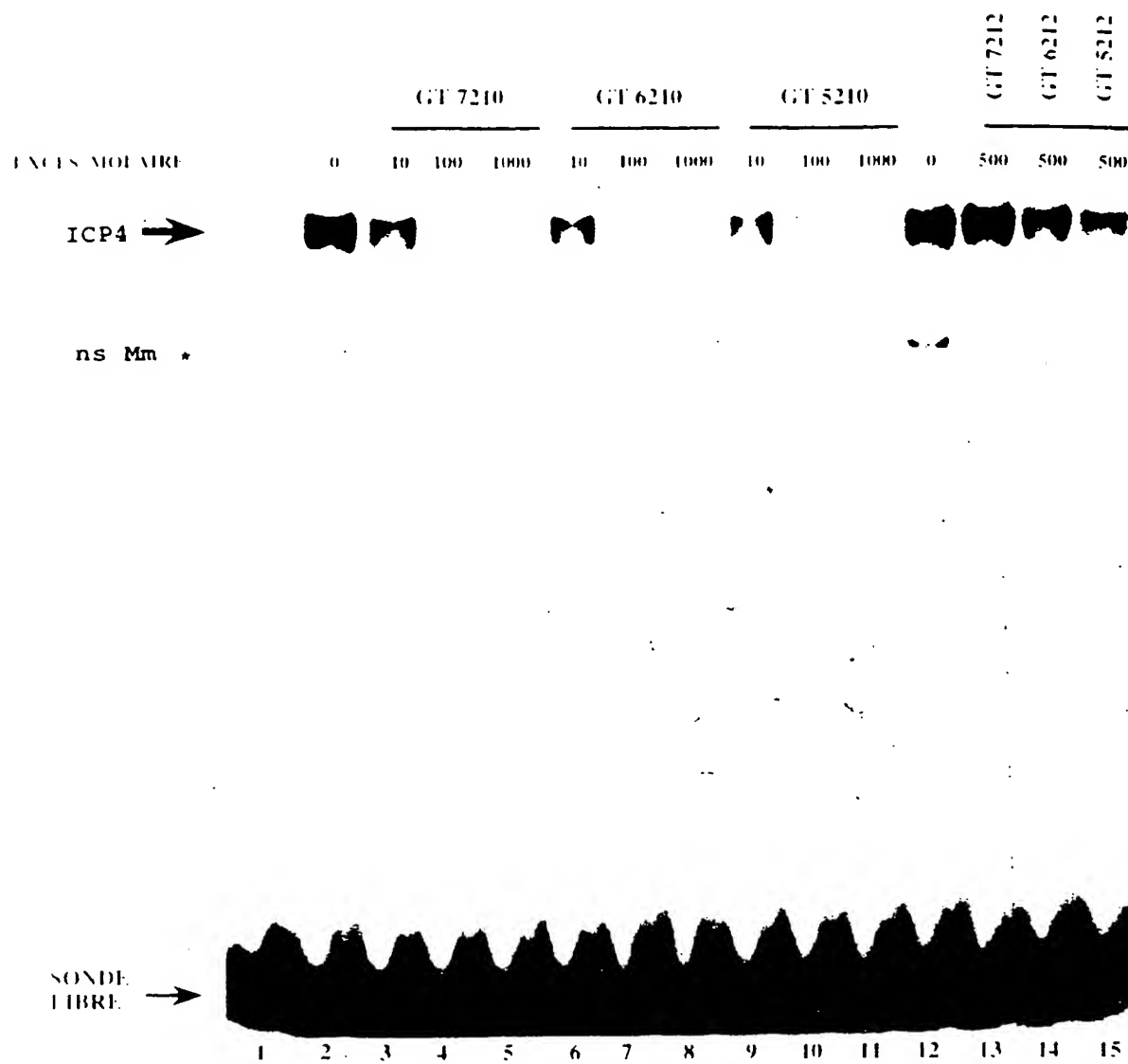
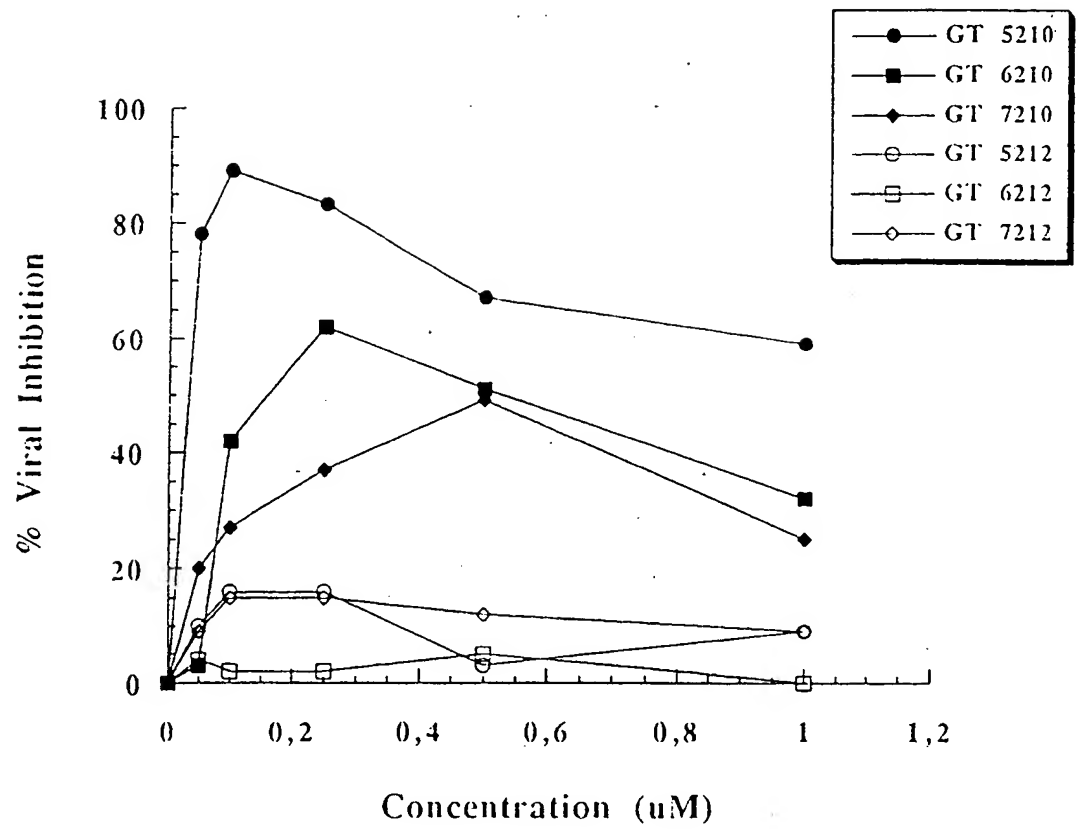


FIG. 3

FIG. 4

FIG. 5

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-95 04141 (GENSET) 9 Février 1995 * page 8, ligne 1 - ligne 24 * ---	1
A	WO-A-94 23026 (GENSET) 13 Octobre 1994 * le document en entier * ---	1
D,A	WO-A-92 19732 (GENSET) 12 Novembre 1992 * le document en entier * ---	1
D,A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 15, 25 Juillet 1993 OXFORD GB, pages 3405-3411, C.CLUSEL ET AL. 'Ex Vivo Regulation of Specific Gene Expression by Nanomolar Concentration of Double-Stranded Dumbbell Oligonucleotides' * le document en entier * ---	1
D,A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 21, 11 Novembre 1992 OXFORD GB, pages 5857-5858, B.C.F.CHU ET AL. 'The Stability of Different Forms of Double-Stranded Decoy DNA in Serum and Nuclear Extracts.' * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
30 Novembre 1995		Scott, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

